Dr hab. Paweł Grzmil, prof. UJ
Pracownia Genetyki i Ewolucjonizmu
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, 28.07.2026

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Cichowskiej-Likszo
pt. „Białkowe markery jakości nasienia najądrzowego psa".

Promotor: dr hab. inż. Marzena Mogielnicka-Brzozowska, prof. UWM

Postęp w rozwoju technik wysokoprzepustowych umożliwił badanie całych genomów, tranksryptomów czy proteomów i choć metody te różnią się w stosowanych technikach to wszystkie umożliwiają globalne analizy przynoszące dużo pełniejszy obraz badanych procesów niż wcześniej stosowane techniki koncentrujące się na pojedynczych genach czy białkach. W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej zastosowano technikę badania proteomu do identyfikacji białek, które mogłyby służyć jako markery oceny jakości nasienia psów jak i mogłyby stanowić wskaźniki postępującego procesu starzenia się samców psów. Poszukiwanie i identyfikacja markerów umożliwiających szybszą i łatwiejszą ocenę jakości nasienia wpisuje się w aktualne trendy biologii rozrodu. W hodowli psów odpowiedni dobór samców o pożądanych parametrach nasienia ma kluczowe znaczenie i może w perspektywie przynieść znaczne korzyści finansowe. Markery jakości nasienia są aktualnie wykorzystywane, dostępne są nawet komercyjne testy do analizy jakości nasienia w oparciu o analizę odpowiednich markerów, dotyczą jednak nasienia ejakulowanego. Jeżeli z różnych przyczyn ejakulat nie jest dostępny, nasienie najądrzowe może być wykorzystane w technikach in vitro, niezbędna jednak jest w takich przypadkach ocena jakości takiego nasienia. W tym świetle podjęta przez doktorantkę tematyka badawcza jest aktualna i oprócz oczywistej wartości naukowej może mieć także przełożenie aplikacyjne.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma formę cyklu trzech monotematycznych artykułów opatrzonych rozbudowanym, 20-sto stronicowym komentarzem doktorantki. W tej części doktorantka zamieściła wstęp, sformułowała cel i hipotezy badawcze, przedstawiła skrótowo materiały i metody badawcze (bardziej szczegółowo metody są opisane w

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel.: +48 12 664 50 06
+48 12 664 50 07
fax: +48 12 664 51 01
sekretariat.izibb@uj.edu.pl
www.izibb.wb.uj.edu.pl

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel.: +48 12 664 50 06
+48 12 664 50 07
fax: +48 12 664 51 01
sekretariat.izibb@uj.edu.pl
www.izibb.wb.uj.edu.pl

publikacjach nr 2 i 3), podsumowała dość szczegółowo najważniejsze uzyskane wyniki, z podziałem na wyniki przedstawione w poszczególnych publikacjach jak i przedstawiła podsumowanie i najważniejsze wnioski. Układ jest typowy dla prac przedstawianych w formie tzw. spinki. Pod względem redakcyjnym komentarz doktorantki jest bardzo starannie opracowany, nie znalazłem wartych przytoczenia niezgrabności językowych czy błędów. Komentarz opatrzony został ryciną podsumowującą model działanie trzech białek zidentyfikowanych jako markery starzenia się najądrza psa. Rycina ta to polskojęzyczna wersja fig. 8 z publikacji nr 3. Przedstawione cele badawcze dotyczą 1) przeglądu biomarkerów molekularnych wskazanych dotychczas jako przydatne w ocenie jakości nasienia psa, 2) analizy proteomu płynu najądrzowego psa w zależności od ruchliwości plemników oraz wieku psa i 3) selekcja potencjalnych markerów białkowych występujących w płynie najądrzowym psa, związanych z ruchliwością plemników najądrzowych i wiekiem zwierzęcia. Celom towarzyszą dobrze i jasno sformułowane hipotezy badawcze. Cele są zasadne i dobrze przedstawione.

Cykl trzech publikacji składa się z artykułu przeglądowego opublikowanego w *Current Issues in Molecular Biology* (MDPI, IF=3) oraz dwóch prac oryginalnych opublikowanych w *International Journal of Molecular Sciences* (MDPI, IF=4,9) i *Reproduction, Fertility and Development* (CSIRO, IF=2,1), wszystkie czasopisma mają zasięg międzynarodowy i są indeksowane w najważniejszych bazach w tym w Web of Science. Doktorantka jest drugim, ostatnim autorem w pracy przeglądowej i pierwszym autorem w obu pracach oryginalnych, co świadczy o jej wiodącym wkładzie w powstanie tych publikacji. Potwierdzają to także oświadczenia współautorów poszczególnych publikacji. Wprawdzie na podstawie oświadczeń dotyczących publikacji nr 1, która ma dwie autorki, promotorkę pracy doktorskiej i doktorantkę, można odnieść wrażenie, że wkład obu autorek było podobny, doktorantka dodatkowo przygotowała ryciny, jednak trudno to uznać za zarzut, gdyż krytyczny nadzór nad powstaniem publikacji jest rolą promotorki. W obu pracach oryginalnych wiodący wkład doktorantki nie budzi wątpliwości (zgodnie z oświadczeniami współautorów).

Pierwsza z cyklu praca przeglądowa dała punkt wyjścia do dalszych badań przeprowadzonych w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej. Przegląd

literatury jest obszerny, zawiera w większości aktualne pozycje (ale także „klasyczne" pozycje pochodzące np. z lat 80-tych ubiegłego stulecia). Na podstawie doboru literatury w tej pracy, ale także w kolejnych pracach oryginalnych oraz literatury zacytowanej w komentarzu doktorantki trzeba stwierdzić, że doktorantka bardzo dobrze orientuje się w podjętej tematyce badawczej i bardzo dobrze dobrała przytaczane piśmiennictwo. Z tej pierwszej publikacji wynika dalsze postępowanie doktorantki. Jak jasno wskazano, większość dotychczasowych badań koncentrowała się u psów na analizie ejakulatu, brak było w dotychczasowej literaturze kompleksowej proteomicznej analizy nasienia najądrzowego.

Druga i trzecia publikacje to prace badawcze, w których analizie proteomicznej poddano płyn ogona najądrza pobrany po sterylizacji 23 psów w wieku od roku do 11 lat. Obie publikacje bazują na tym samym materiale badawczym i wynikach tej samej analizy proteomu, jednak opracowanie bioinformatyczne było prowadzone w innych kierunkach. W pracy nr 2 skupiono się na poszukiwaniu markerów, które mogłyby służyć ocenie ruchliwości plemników. Przeanalizowano liczebność plemników jak i parametry ruchliwości za pomocą systemu CASA. Psy podzielono na dwie grupy, GSM czyli grupę o dobrej ruchliwości plemników (parametr PMOT>55%) i PSM czyli grupę o słabej ruchliwości (PMOT<55%). Analizę proteomou przeprowadzono za pomocą techniki nanoUPLC-Q-TOF/MS. Po analizie zsekwencjonowanych peptydów w bazie UniProt zidentyfikowano 6 białek obecnych tylko w płynie ogona najądrza osobników z grupy GSM, 4 białka obecne w grupie PSM i 11 białek obecnych w obu grupach, z których część wykazywała zróżnicowaną ekspresję pomiędzy grupami. Skupiono się na analizie tych 11 wspólnych białek pod kątem ich przydatności jako biomarkery. Warto docenić, że poziom ekspresji trzech białek wykazujących zróżnicowany poziom ekspresji w obu grupach zweryfikowano techniką Western blot, obserwacje pochodzące z analizy proteomu potwierdzono dla dwóch spośród tych trzech białek. W pracy tej zaproponowano cztery białka: ALB, CRISP2, LCNL1 i PTGDS jako potencjalne markery, których ilość różnicuje grupy GSM i PSM. W ostatniej trzeciej publikacji przeanalizowano wcześniej uzyskane wyniki analizy proteomu pod kątem związku zmiany ilości poszczególnych białek z wiekiem psów. Zwierzęta podzielono na trzy

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel.: +48 12 664 50 06
+48 12 664 50 07
fax: +48 12 664 51 01
sekretariat.izibb@uj.edu.pl
www.izibb.wb.uj.edu.pl

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel.: +48 12 664 50 06
+48 12 664 50 07
fax: +48 12 664 51 01
sekretariat.izibb@uj.edu.pl
www.izibb.wb.uj.edu.pl

grupy: młode (1-3 lat), dorosłe (3,5-6 lat) i stare (6,5 do 11 lat), wszystkie grupy o odpowiedniej liczebności (8, 8 i 7). Analiza proteomu pod tym kątem pozwoliła zidentyfikować po jednym białku obecnym jedynie w płynie ogona najądrza osobników dorosłych i starych, pięciu białek obecnych jedynie u osobników młodych, czterech białek obecnych wspólnie u osobników młodych i starych, ośmiu białek obecnych wspólnie u osobników dorosłych i starych jak i 7 białek wspólnych dla wszystkich grup wiekowych, część z nich wykazywała zróżnicowany poziom ekspresji w poszczególnych grupach. W dalszej części skupiono się na tej ostatniej grupie 7 białek i wytypowano trzy: ALB, GPX5 i PTGDS, których zmiana poziomu ekspresji mogłaby stanowić molekularny marker procesu starzenia się najądrza psów. W pracach zastosowano nowoczesną metodykę badawczą jak i narzędzia do opracowania wyników analiz proteomicznych. Na uwagę zasługuje kompleksowa analiza danych proteomicznych i przedstawienie ich w publikacjach w formie diagramów i map cieplnych. Dodatkowo analizy GO i KEGG umożliwiły identyfikacje procesów biologicznych jak i ścieżek metabolicznych do których należały zidentyfikowane białka o zróżnicowanej ekspresji zarówno w najądrzach psów o wysokiej i niskiej ruchliwości plemników jak i w różnych grupach wiekowych. Uzyskane dane dostarczają więc nowych informacji o procesach kontrolujących jakość plemników jak i procesach związanych ze starzeniem się najądrzy psów. Oprócz wartościowych nowych danych z zakresu badań podstawowych uzyskane wyniki mogą stanowić punkt wyjścia do zastosowania zidentyfikowanych białek jako markerów i opracowaniu komercyjnych testów o zastosowaniu aplikacyjnym. Dlatego uważam przedstawione wyniki za wartościowe. Wyniki w obu publikacjach są przedstawione w sposób klarowny, poprawnie opracowane i wyczerpująco przedyskutowane. Ponadto, w mojej opinii, podzielenie analiz proetomu na dwa opracowania (dwie publikacje) dotyczące osobno ruchliwości plemników i wieku psów znacznie podniosło klarowność przekazu i było bardzo dobrym pomysłem.

Wszystkie publikacje jak i komentarz doktorantki wskazują na jej bardzo obszerną wiedzę ogólną i bardzo dobre rozeznanie w dyscyplinie w której podjęła się prowadzić badania. Najbardziej świadczy o tym publikacja nr 1. Kolejne dwie publikacje jasno wskazują, że doktorantka posiada

umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, krytycznej analizy otrzymanych wyników i odniesienia ich do aktualnej wiedzy. Nie znalazłem w przedstawionej rozprawie nadinterpretacji czy nieuprawnionych spekulacji. Na koniec tej części recenzji chciałbym zaznaczyć, że oceniałem treść poszczególnych publikacji a nie wydawnictwo, w którym się ukazały. Znam opinię części środowiska na temat MDPI, jednak uważam, że należy przede wszystkim ocenić jakość publikacji.

Choć nie znalazłem ewidentnych nieprawidłowości ma kilka uwag i pytań do doktorantki:

- w komentarzu doktorantki na str. 26 doktorantka podaje, że „wartości TMOT, PMOT, VSL, BCF, STR i LIN były wyższe w grupie GSM". Jest to ciekawa obserwacja jednak nie dla parametru PMOT. Obie badane grupy czyli GSM i PSM zostały wydzielone na podstawie wartości PMOT (powyżej i poniżej 55%), dlatego analiza rozkładu tego parametru w tych dwóch grupach nie ma sensu.
- ciekawą obserwacją jest wyższa wartość prędkości ruchu plemników VSL w grupie GSM oraz wyższa wartość VCL i ALH w grupie PSM. Czy można prosić o komentarz (nie znalazłem go ani w komentarzu doktorantki ani w publikacji). Czy to oznacza, że w grupie zdefiniowanej jako „poor sperm motility" ruch plemników jest mniej postępowy? Świadczyłyby o tym wyższe wartości STR i LIN w grupie GSM. Ale wysoki BCF często świadczy o ruchach oscylacyjnych czy kręceniu się w kółko plemników. Czy w tym przypadku wysoki BCF w grupie GSM świadczy po prostu o intensywnej pracy witki ?
- Poszukując markerów doktorantka skupiała się głównie na białkach wspólnych dla badanych grup (GSM i PSM oraz grup wiekowych). Dlaczego ? Czy białka unikatowe dla poszczególnych grup nie są lepszymi kandydatami na markery ? Czy chodzi o częstość identyfikacji tych białek u odpowiedniej liczby osobników ? Poprosiłbym o wyjaśnienie.
- aby marker znalazł szerokie zastosowanie aplikacyjne musi być łatwo wykrywalny. Czy doktorantka zastanawiała się nad kolejnymi etapami badań pod tym kątem? Czy zidentyfikowane białka są na tyle unikatowe aby próbować opracować np. test ELISA, lub inny ?

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel.: +48 12 664 50 06
+48 12 664 50 07
fax: +48 12 664 51 01
sekretariat.izibb@uj.edu.pl
www.izibb.wb.uj.edu.pl

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

Ocena końcowa

Podsumowując pragnę podkreślić, że praca mgr inż. Aleksandry Cichowskiej-Likszo pt. „Białkowe markery jakości nasienia najądrzowego psa" jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego. Doktorantka wykazała duże umiejętności prowadzenia eksperymentalnych badań naukowych, stosowania najnowszych i adekwatnych technik badawczych, zdolność wnikliwej analizy i interpretacji wyników. Uzyskane wyniki poza niewątpliwą wartością naukową mają także potencjał aplikacyjny. W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Cichowskiej-Likszo spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r., Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz.1668 z póz. zm.). Tym samym wnoszę do Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Z poważaniem,

Podpisuję z Cencert

Podpisany elektronicznie przez
Paweł Grzmil
28.07.2026
13:44:33 +02'00'

Paweł Grzmil

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel.: +48 12 664 50 06
+48 12 664 50 07
fax: +48 12 664 51 01
sekretariat.izibb@uj.edu.pl
www.izibb.wb.uj.edu.pl